

АДАПТАЦИЯ *ANADARA KAGOSHIMENSIS* (ТОКУНАГА, 1906) К ГИПО- И ГИПЕРОСМОТИЧЕСКИМ УСЛОВИЯМ СРЕДЫ: РЕАКЦИЯ ГЕМОЦИТОВ

© 2023 Кухарева Т.А.*, Рычкова В.Н.**, Солдатов А.А.***, Андреева А.Ю.****,
Кладченко Е.С.*****

ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН»,
г. Севастополь, 299011, Россия

e-mail: *altali@yandex.ru; **novitsky_valya@mail.ru; ***alekssoldatov@yandex.ru; ****andreevaal@gmail.com;
*****kladchenko_ekaterina@bk.ru

Поступила в редакцию 13.12.2022. После доработки 28.08.2023. Принята к публикации 01.09.2023

Anadara kagoshimensis (Tokunaga, 1906) – вид-вселенец, успешно колонизировавший акваторию Чёрного и Азовского морей, несмотря на значительно меньший уровень солёности этих вод в сравнении с родным регионом. Методом светооптической микроскопии оценены морфологические и морфометрические характеристики эритроцитов двустворчатого моллюска *A. kagoshimensis* при адаптации к гипо- и гиперосмотическим экспериментальным нагрузкам. Контрольную группу моллюсков содержали при солёности 18‰. Экспериментальные группы – при 8, 14, 35 и 45‰. Снижение солёности достигалось путём разбавления морской воды дистиллированной со скоростью $1.5 \pm 0.5\%$ в сутки. Для повышения солёности в аквариумы добавляли морскую соль. Солёность повышали со скоростью $2.5 \pm 0.5\%$ в сутки. Экспозиция – 2 дня. Установлено, что диапазон солёности 14–35‰ для анадары является естественным. Значительных изменений морфологии клеток в данных условиях не наблюдали. Вместе с тем нахождение в среде с уровнем солёности 8 и 45‰ вызывало явное напряжение: появлялись клеточные аномалии, менялись размерные характеристики эритроцитов. Однако лизиса клеток не происходило, значения удельной поверхности и ядерно-цитоплазматического отношения сохранялись. Это свидетельствует о способности анадары некоторое время существовать в регионах с экстремальными гипо- и гиперосмотическими условиями.

Ключевые слова: анадара, эритроциты, гипо- и гиперосмотический стресс, светооптическая микроскопия, морфометрия.

DOI: 10.35885/1996-1499-16-3-117-125

Введение

Anadara kagoshimensis (Tokunaga, 1906) (далее анадара) – двустворчатый моллюск, который широко представлен в малакофауне Индо-Пацифики: прибрежных водах Индии, Шри-Ланки, Индонезии, Японии и Австралии [Routiers, 1998]. В Чёрное и Азовское море этот вид-вселенец был занесён вместе с балластными водами судов [Шиганова, 2009]. Впервые анадара была обнаружена у берегов Кавказа в 1968 г. [Киселёва, 1992]. В последующие годы она массово колонизировала прибрежные воды Чёрного и Азовского морей и стала одним из доминирующих бентосных видов [Revkov et al., 2008]. Широкому расселению способствовала высокая степень эврибионтности анадары. Показана её толерантность к острым формам гипоксии (анок-

сии) [Андреевко и др., 2009; Soldatov et al., 2021], сероводородному заражению [Soldatov et al., 2018]. Освоение азово-черноморского региона типично океаническим видом допускает его способность к существованию в гипоосмотических условиях среды. Особенно это касается Азовского моря, где *Anadara kagoshimensis* получила широкое распространение [Zhivoglyadova et al., 2021]. Однако пределы осмотической толерантности её изучены недостаточно.

Известно, что морские двустворчатые моллюски являются типичными осмоконформерами [McFarland et al., 2013, Solan, Whiteley 2016]. Осмолярность их внутренней среды (гемолимфы) соответствует внешнему окружению. В этом случае решающее значение приобретает способность клеточных си-

стем осмоконформера компенсировать гипо- или гиперосмотическую нагрузку. Удобными элементами для изучения процессов осморегуляции являются клетки гемолимфы (гемоциты). У анадары они в массе представлены эритроидными формами, что отличает её от других видов двустворок [Holden et al., 1994; Morello et al., 2004]. Было показано, что снижение солёности приводит к уменьшению общего числа гемоцитов у *Anadara kagoshimensis*, обитающей у берегов Китая. Однако при этом возрастала их фагоцитарная активность, а также способность генерировать АФК [Zhang et al., 2019]. В условиях эксперимента была изучена способность гемоцитов черноморской анадары реагировать на дефицит кислорода и сероводородное заражение водной среды. При этом отмечали изменения формы, размеров клеток и их ядер, числа гранулярных включений, образование характерных аномалий и т. д. [Soldatov et al., 2018, 2021]. Это означает, что гемоциты чувствительны к условиям внешней среды и их можно использовать в качестве маркера состояния организма моллюска в целом.

В настоящей работе в условиях эксперимента *in vivo* предпринята попытка определения диапазона осмотической толерантности организма анадары. Исследуются эритроидные элементы гемолимфы моллюска. Анализируются их морфологические и морфометрические характеристики в условиях гипо- и гиперосмотических нагрузок.

Материал и методика

Работа проводилась на двустворчатых моллюсках (*A. kagoshimensis* Tokunaga, 1906). Исследовано 50 особей (сырая масса вместе с раковиной – 15.6 ± 1.5 г, диаметр створки – 35.5 ± 1.1 мм). Моллюсков отбирали осенью 2020 г. в Чёрном море близ г. Севастополя (координаты точки сбора 44.60° с. ш., 33.44° в. д., температура воды 20°C , солёность 18.3 ‰, содержание кислорода 8.5 мг/л) и доставляли в лабораторию в пластиковых контейнерах без воды. В лаборатории анадару рассаживали в аквариумы, плотность посадки – одна особь на 3–5 литров. В аквариумах поддерживались условия близкие к месту сбора материала: температура – $23.3 \pm 0.1^\circ\text{C}$,

солёность – 18.2 ± 0.02 ‰, pH – 8.1 ± 0.01 , содержание кислорода – 7.7 ± 0.1 мг/л. Содержание кислорода и температуру воды оценивали при помощи портативного оксиметра с температурным датчиком ST300D (Ohaus, США). Солёность и pH воды контролировали при помощи портативного кондуктометра-солемера sensION 5 HACH (США) и pH-метра ST2100-F (Ohaus, США).

Для оценки диапазонов солёносной адаптации моллюсков разделили на 5 групп по 10 особей в каждой. Контрольная группа содержалась при солёности 18 ‰, экспериментальные при 8 ‰, 14 ‰, 35 ‰ и 45 ‰. Экспериментальное снижение солёности (точки 14 ‰ и 8 ‰) достигалось путём разбавления морской воды дистиллированной со скоростью 1.5 ± 0.5 ‰ в сутки. После достижения необходимых значений солёности, моллюсков выдерживали в заданных экспериментальных условиях 2 суток. Для повышения солёности до 35 ‰ и 45 ‰ в экспериментальные аквариумы постепенно добавляли соль (Red sea salt, France). Солёность повышалась со скоростью 2.5 ± 0.5 ‰ в сутки. После достижения солёности 35 ‰ (через 6 суток, без учёта периода акклимации) и 45 ‰ (ещё через 4 суток) экспозиция в экспериментальных условиях составляла 2 суток. На протяжении всего эксперимента, включая период акклимации к лабораторным условиям, для удаления метаболитов ежедневно меняли воду, с сохранением значения солёности. Моллюсков кормили смесью микроводорослей *Tetraselmis viridis* (штамм IBSS–25) из коллекции Отдела биотехнологии и фиторесурсов ФИЦ ИнБЮМ. На каждые 50 л аквариумной воды вносили 5–10 мл взвеси микроводорослей. Температура воды, содержание кислорода и значение pH поддерживались на уровне контроля в течение всего экспериментального периода.

Гемолимфу для анализа отбирали стерильным шприцем из экстрапаллиальной полости моллюска, затем трижды отмывали в стерильной морской воде в течение 5 минут (500 г) и пропускали через фильтр с диаметром ячейки 20 мкм для удаления агрегатов. После отмывки клетки концентрировали и готовили мазки. Окраску мазков проводили по комбинированному методу Паппенгейма [Зо-

лотницкая, 1987]. Мазки анализировали при помощи светового микроскопа (Biomed PR-2 Lum), оборудованного камерой (Levenhuk C NG Series). В программе ImageJ 1.44 р по фотографиям измеряли большой (C_1) и малый (C_2) диаметры клеток (без учёта псевдоподий) и их ядер (N_1, N_2).

На основании полученных значений рассчитывали объём и площадь поверхности у отдельных клеток (V_c, S_c) и их ядер (V_n, S_n) [Новицкая, Солдатов, 2013]. Затем определяли удельную поверхность клеток (S_c/V_c) и ядерно-цитоплазматическое отношение (V_n/V_c). На каждом мазке подсчитывалось не менее 1000 клеток.

Нормальность распределения проверяли при помощи теста Колмогорова – Смирнова. Различия между группами анализировали с помощью программного обеспечения RStudio версия 4.1.0 (R Core Team, 2021). Данные анализировали с использованием дисперсионного анализа (ANOVA). Достоверность результатов проверяли при помощи критерия

Тьюки с доверительным интервалом 95%. Результаты выражены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего.

Результаты

Выживаемость особей. Гипо- и гиперосмотическая нагрузка не вызвала гибели *Anadara kagoshimensis*. Створки раковины моллюска оставались приоткрытыми на протяжении всех этапов эксперимента.

Морфология эритроцитов. На мазках были обнаружены эритроциты анадары, которые представляли собой крупные округлые клетки слегка вытянутой формы со средним диаметром большой и малой оси 16.2 ± 0.1 мкм и 13.3 ± 0.1 мкм, соответственно (рис.1, С). Иногда встречались случаи образования псевдоподий. В цитоплазме присутствовали множественные гранулярные включения. Ядро небольшое, диаметр осей – 5.0 ± 0.03 мкм и 3.7 ± 0.03 мкм, располагалось ацентрично. Окраска ядра базофильная, хроматин высоко концентрирован.

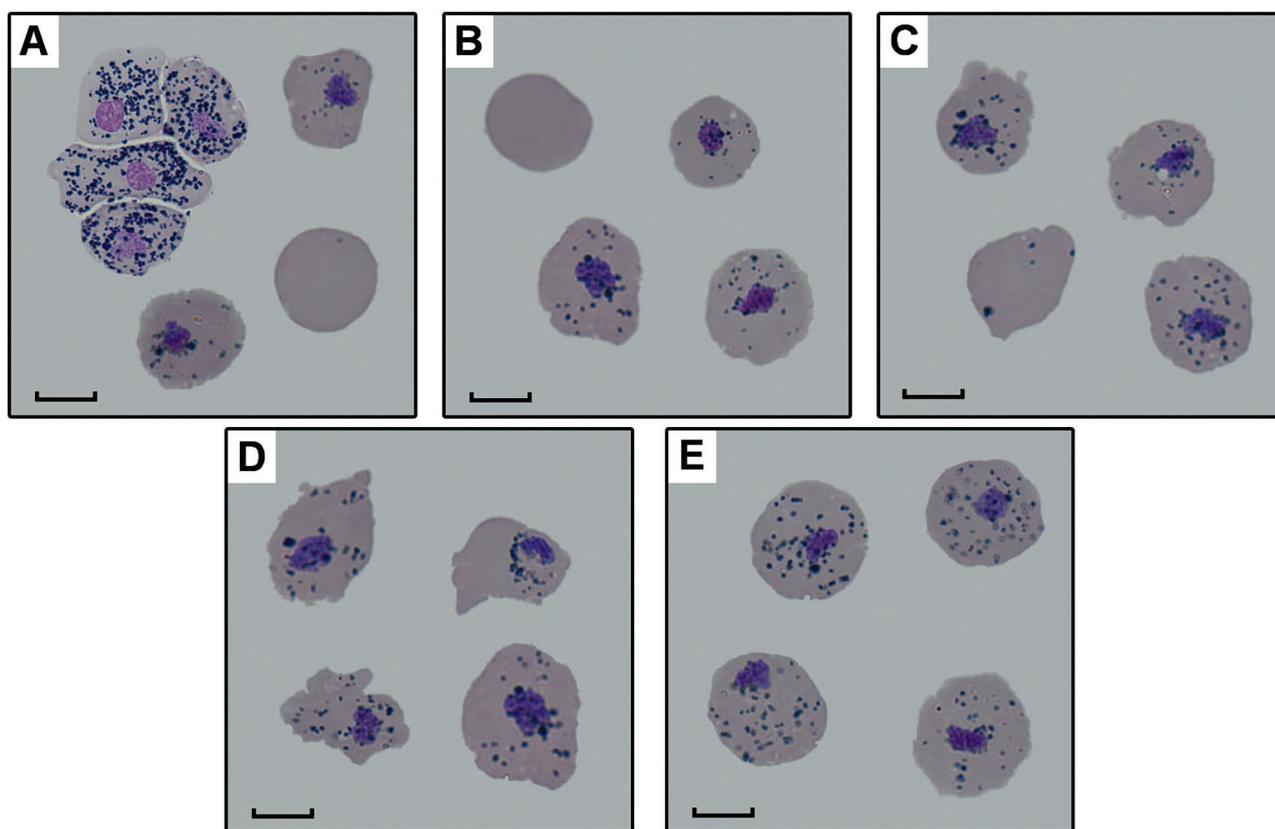


Рис. 1. Влияние уровня солёности на морфологические характеристики эритроцитов *A. kagoshimensis*: А – уровень солёности 8 ‰, В – уровень солёности 14 ‰, С – уровень солёности 18 ‰ (контрольный уровень), D – уровень солёности 35 ‰, E – уровень солёности 45 ‰. Линейка соответствует 10 мкм.

В результате гипо- и гиперосмотического воздействия морфологические особенности эритроцитов претерпевали ряд изменений. При снижении солёности до 14 ‰ эритроциты и их ядра приобретали неправильную форму, зёрна при этом смещались ближе к ядру. Количество псевдоподий у клеток становилось меньше. Наблюдали появление в гемолимфе безъядерных клеток (рис. 1, В). При дальнейшем снижении солёности до 8 ‰ описанные морфологические изменения сохранялись, кроме того, клетки набухали и начинали образовывать агрегаты, которые наблюдались по всей площади мазка (рис. 1, А). Однако увеличения численности эритроцитарных теней, которые отображают случаи лизиса, не наблюдали.

Увеличение уровня солёности до 35 ‰ также приводило к нарушениям формы клеток и ядер, число псевдоподий у клеток увеличивалось. Зёрна концентрировались вокруг ядра (рис. 1, D). Однако при дальнейшем повышении солёности до 45 ‰ форма клеток вновь становилась округлой, а зёрна располагались равномерно вокруг ядра. Псевдоподии у клеток практически не наблюдались (рис. 1, E). Роста числа эритроцитарных теней также не отмечали.

Линейные размеры клеток. Изменения уровня солёности морской воды статистически значимо влияли на размерные характеристики клеток (рис. 2, А, В). Снижение солёности привело к возрастанию длины большой и малой оси клеток, которая составила 17.1 ± 0.1

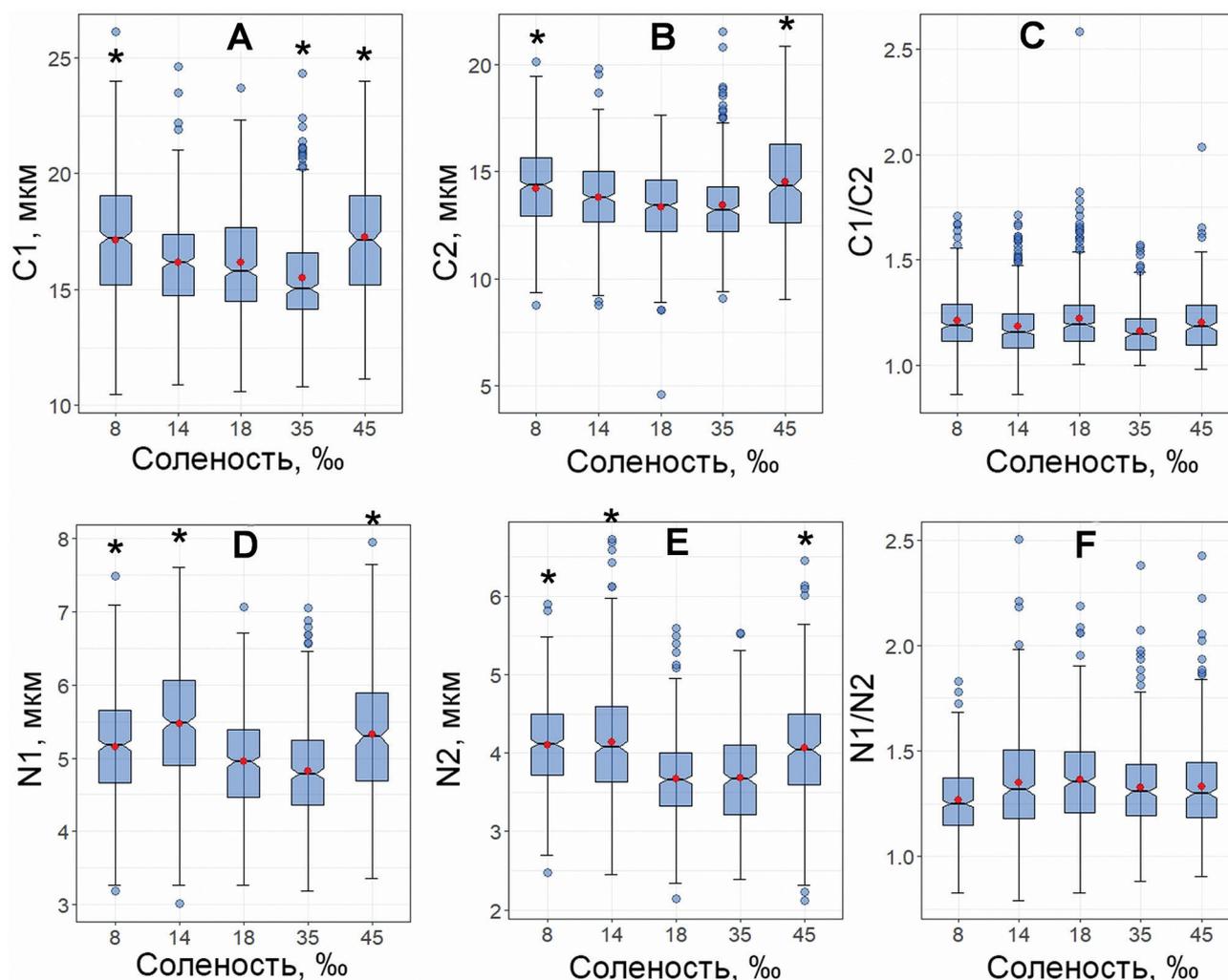


Рис. 2. Влияние уровня солёности на размерные характеристики эритроцитов и их ядер у *A. kagoshimensis*: А – длина большой оси клетки, В – длина малой оси клетки, С – соотношение длин большой и малой осей клетки, D – длина большой оси ядра, E – длина малой оси ядра, F – соотношение длин большой и малой осей ядра. * – существуют достоверные различия между опытной и контрольной группой ($p < 0.05$).

мкм и 14.2 ± 0.1 мкм при уровне солёности воды 8 ‰. Увеличение солёности воды до 35 ‰ вызвало некоторое уменьшение длины большой оси (15.5 ± 0.1 мкм) на фоне роста малой оси (13.4 ± 0.1 мкм), однако при солёности воды 45 ‰ длина обеих осей возрастала (17.2 ± 0.2 мкм и 14.5 ± 0.1 мкм). Значения в крайних точках, соответствующих 8 ‰ и 45 ‰ солёности, были на 6–8% выше контрольных значений ($p < 0.05$). Отношение осей C_1/C_2 в ходе эксперимента существенно не изменялось и находилось на уровне 1.1–1.3 (рис. 2, С).

Линейные размеры ядра. Изменения претерпевали и размерные характеристики ядер эритроцитов (рис. 2, D, E). Снижение уровня солёности воды до 14 ‰ вызвало набухание ядер: длина большой и малой оси возросла до

5.5 ± 0.04 мкм и 4.1 ± 0.04 мкм, соответственно. Дальнейшее опреснение (8 ‰) сопровождалось некоторым снижением этих значений до 5.15 ± 0.03 мкм и 4.1 ± 0.02 мкм. Засоление воды привело к росту большой и малой оси ядра, и при её солёности 45 ‰ эти длины составили 5.3 ± 0.1 мкм и 4.1 ± 0.04 мкм, соответственно. В крайних точках, соответствующих солёности 8 ‰ и 45 ‰, размеры большой и малой осей ядра (N_1, N_2) были на 4–7% больше контрольных значений ($p < 0.05$). Соотношение осей ядра (N_1/N_2) в ходе эксперимента при всех солёностях воды находилось на уровне 1.2–1.5 (рис. 2, F).

Объёмные характеристики эритроцитов и их ядер. Рост диаметра большой и малой оси в условиях гипоосмотической нагрузки привёл к закономерному увеличе-

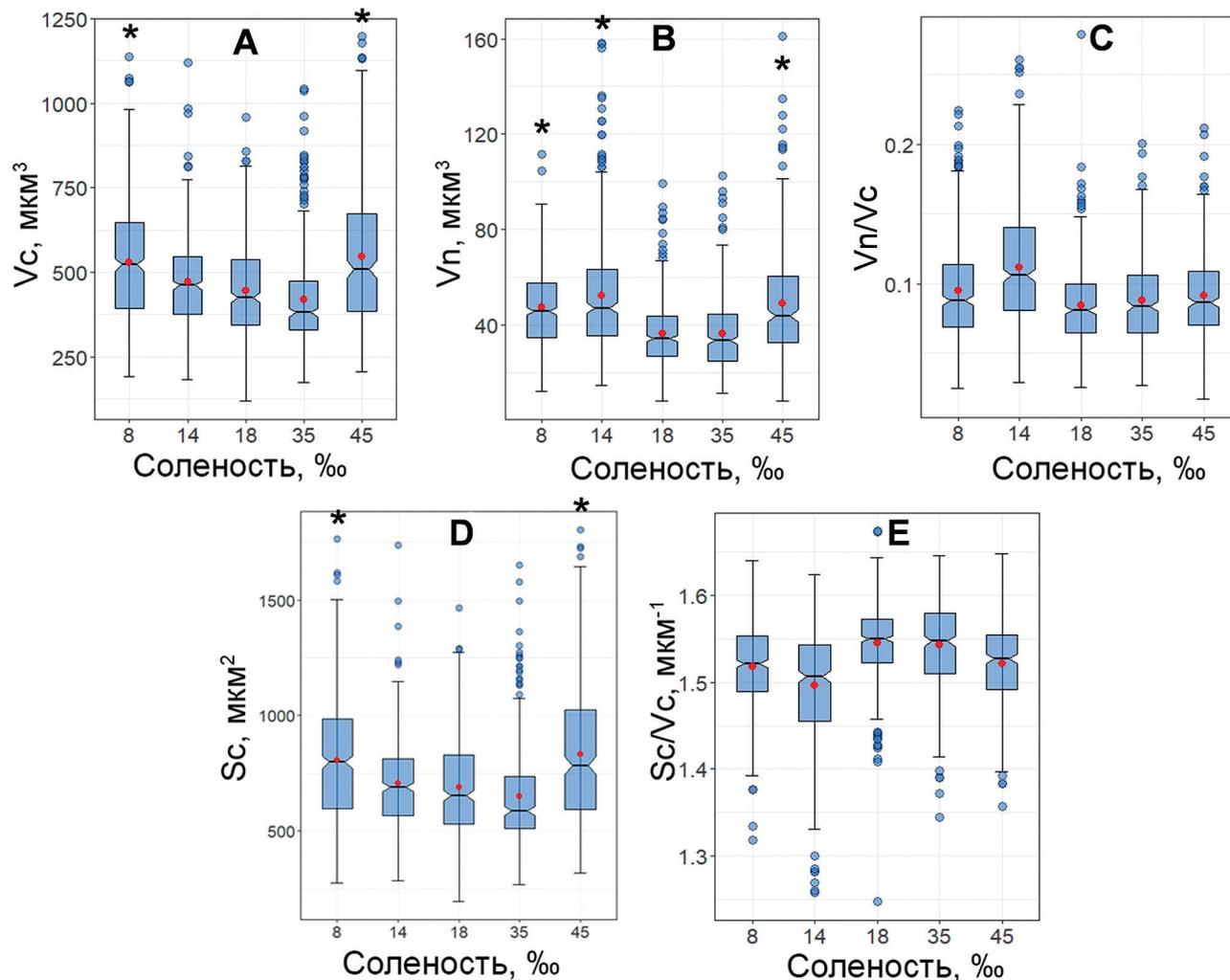


Рис. 3. Влияние уровня солёности на расчётные характеристики эритроцитов и их ядер у *A. kagoshimensis*: А – объём эритроцитов, В – объём ядра эритроцитов, С – ядерно-цитоплазматическое отношение, D – общая площадь поверхности эритроцитов, Е – удельная площадь поверхности эритроцитов. * – существуют достоверные различия между опытной и контрольной группой ($p < 0.05$).

нию объёма эритроцитов (V_c) (рис. 3, А). При солёности воды 8 ‰ V_c составил 529.4 ± 8.4 мкм³, что на 19% выше уровня контроля ($p < 0.05$). Гиперосмотическая нагрузка вначале приводила к некоторому снижению объёма до 420.4 ± 7.6 мкм³ при 35 ‰, а затем к его росту до 547.3 ± 12.1 мкм³ при солёности воды 45 ‰, что на 23% выше контрольных значений ($p < 0.05$). Объём ядра (V_n) увеличился на треть в условиях минимальной и максимальной солёности и составил 47.3 ± 0.8 мкм³ и 48.9 ± 1.3 мкм³ при солёностях воды 8 ‰ и 45 ‰, соответственно ($p < 0.05$) (рис. 3, В). При этом максимальное значение объёма ядра (52.2 ± 1.2 мкм³) регистрировали при солёности воды 14 ‰. Изменения объёма ядра были количественно сопоставимы с изменением объёма клеток, о чём свидетельствует отсутствие существенных различий между значениями ядерно-цитоплазматического отношения V_n/V_c у контрольной и опытных групп (рис. 3, С).

Общая и удельная площадь поверхности эритроцитов. Общая площадь поверхности эритроцитов (S_c) возрастала в гипосмотических условиях и составила 804.2 ± 12.9 мкм² при 8 ‰. В гиперосмотических условиях S_c вначале несколько снижалась при 35 ‰, а затем увеличивалась до 829.9 ± 17.9 мкм² при 45 ‰ (рис. 3, D). В крайних точках, соответствующих 8 ‰ и 45 ‰, общая площадь поверхности эритроцитов была выше в 1.2 раза в сравнении с контрольными значениями ($p < 0.05$). Удельная поверхность клетки S_c/V_c оставалась на уровне 1.5 мкм⁻¹ в ходе эксперимента (рис. 3, E).

Обсуждение результатов

Из представленной выше информации необходимо акцентировать внимание на следующих моментах, которые стоит обсудить:

- гипосмотическая нагрузка сопровождалась устойчивым ростом средноклеточного объёма клеток красной крови и их ядер;
- аналогичные изменения наблюдали и в условиях гиперосмотических нагрузок; при этом увеличение объёма клеток было более выраженным (до 23%);
- морфологические изменения эритроидных форм были незначительны и сводились

в основном к изменению формы клеточных ядер, дислокации зернистых включений, изменению числа псевдоподий; агрегирование клеток отмечали только при 8 ‰, при этом образования эритроцитарных теней не наблюдали.

Увеличение объёма эритроцитов в гемолимфе анадары в условиях гипосмотической нагрузки ожидаемо, ввиду гидратации гемолимфы и цитоплазмы клеток, что обычно происходит в организме осмоконформеров [Bregante et al., 2016]. Однако оно составило не более 19%, что допускает развитие процессов, направленных на снижение клеточного объёма (regulatory volume decrease, RVD). В основе данного процесса может лежать катионно-анионный обмен на уровне клеточных мембран по схеме: K^+Cl^- симпорт и (или) K^+H^+ антипорт [Cossins, Gibson, 1997]. В обоих случаях из клетки выводится осмотически связанная вода. В отношении гемоцитов мидий допускается первый процесс [Bregante et al., 2016]. Не исключается из внимания и выведение органических осмолитов, таких как таурин и бетаин [Jackson et al., 1994; Torre et al., 2013].

При гиперосмотической нагрузке реакции организма были более сложными. Нагрузка средней интенсивности (35 ‰) сопровождалась незначительным уменьшением клеточного объёма гемоцитов, без какой-либо его последующей коррекции. Эта реакция вполне естественна, ввиду гипертонии гемолимфы. Однако нахождение в среде при солёности 45‰ сопровождалось существенным увеличением объёма клеток красной крови. Это можно объяснить только процессами регуляторного увеличения объёма (regulatory volume increase, RVI). В основе этого может лежать вход гидратированных ионов в клетку: Na^+/H^+ обменник, а также Na^+ , K^+ и Cl^- котранспорт [Cossins, Gibson, 1997].

Можно допустить развитие процессов осморегуляции по типу RVD и RVI на уровне эритроцитов анадары при адаптации к гипо- и гиперосмотическим условиям среды. Однако, в таком случае, эти процессы далеки от совершенства. Это видно из того, что клеточный объём не возвращается к исходным значениям. В то же время, развития каких-либо

существенных клеточных аномалий не происходит. Главное, в гемолимфе не отмечалось повышение числа эритроцитарных теней, которые фактически представляют собой разрушенные клетки. Это можно объяснить только высокой осмотической стойкостью клеток красной крови, которая была зарегистрирована для эритроцитов анадары ранее [Новицкая, Солдатов, 2011]. Последнее отражает высокую эластичность цитоплазматической мембраны клеток, что скорее является следствием особенностей их фосфолипидного состава.

Из представленной информации следует, что диапазон солёности 14–35 ‰ лежит в пределах диапазона осмотической толерантности анадары. Об этом свидетельствует отсутствие заметных изменений в морфологии и морфометрии клеток красной крови. Нахождение в среде, имеющей солёность 8 и 45 ‰, вызывает некоторое напряжение. Оно выражается в увеличении объёма клеток красной крови, что свидетельствует о несовершенстве процессов осморегуляции по типу RVD и RVI. Это в значительной степени компенсируется высокой осмотической стойкостью эритроидных клеток. При этом удельная поверхность клеток красной крови сохраняется, что важно для полноценного выполнения респираторной функции гемолимфы. Все эти адаптивные механизмы, по-видимому, позволяют анадаре успешно осваивать гипоосмотические акватории Чёрного и Азовского морей [Ryvkov et al., 2008; Zhivoglyadova et al., 2021], а также некоторое время выдерживать крайне низкие (8 ‰) и высокие (45 ‰) значения солёности водной среды.

Заключение

Таким образом, диапазон солёности воды 14–35 ‰ для организма анадары является зоной функционального комфорта. Об этом свидетельствует отсутствие значительных изменений морфологии и морфометрии у клеток красной крови. Границами осмотической толерантности данного вида, по-видимому, являются солёности воды 8 и 45 ‰. При таких величинах отмечается значительное изменение линейных и объёмных характери-

стик эритроидных элементов, появляется ряд клеточных аномалий (форма ядер, локализация зернистых включений, изменение числа псевдоподий) и существенно увеличивается клеточный объём. Однако разрушения клеток не происходит, что свидетельствует в пользу их высокой осмотической стойкости. Сохраняется и удельная поверхность эритроцитов. Это означает, что организм анадары в течение некоторого времени способен выдерживать пребывание в условиях экстремальных гипо- и гиперосмотических нагрузок.

Финансирование работы

Исследование влияния гипоосмотической нагрузки на гемоциты анадары выполнено в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ «Закономерности организации иммунной системы промысловых гидробионтов и исследование влияния факторов внешней среды на функционирование их защитных систем» (№ 121102500161-4). Исследование влияния гиперосмотической нагрузки на гемоциты анадары выполнено в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ «Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом» (№121041400077-1).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Соблюдение этических стандартов

Все экспериментальные протоколы были выполнены в соответствии с руководящими принципами ЕС по использованию лабораторных животных и уходу за ними (86/609 / СЕЕ) и при соблюдении правил, утверждённых распоряжением Президиума АН СССР от 2 апреля 1980 N 12000-496 и приказом Минвуза СССР от 13 сентября 1984 N 22. Все усилия были предприняты, чтобы использовать только минимальное количество животных, необходимое для получения надёжных научных данных.

Литература

- Андреев Т.И., Солдатов А.А., Головина И.В. Адаптивная реорганизация метаболизма у двустворчатого моллюска *Anadara inaequalis* Bruguiere в условиях экспериментальной аноксии // Доклады Национальной академии наук Украины. 2009. № 7. С. 155–160.
- Золотницкая Р.П. Методы гематологических исследований // Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник. М.: Медицина, 1987. С. 106–148.
- Киселёва М.И. Сравнительная характеристика донных сообществ у берегов Кавказа // Многолетние изменения зообентоса Чёрного моря. Киев: Наук. думка, 1992. С. 84–99.
- Новицкая В.Н., Солдатов А.А. Эритроидные элементы гемолимфы *Anadara inaequalis* (Mollusca: Arcidae) в условиях экспериментальной аноксии: функциональные и морфометрические характеристики // Морской экологический журнал. 2011. Т. 10. № 1. С. 56–64.
- Новицкая В.Н., Солдатов А.А. Особенности функциональной морфологии эритроидных элементов гемолимфы двустворчатого моллюска *Anadara inaequalis*, Чёрное море // Гидробиологический журнал. 2013. Т. 49. № 4. С. 69–77.
- Шиганова Т.А. Чужеродные виды в экосистемах южных внутренних морей Евразии // Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2009. 56 с.
- Bregante M., Carpaneto A., Piazza V., Sbrana F., Vassalli M., Faimali M. & Gambale F. Osmoregulated chloride currents in Hemocytes from *Mytilus galloprovincialis* // PloS one. 2016. Vol. 11, No. 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167972>
- Cossins A.R., Gibson J.S. Volume-sensitive transport systems and volume homeostasis in vertebrate red blood cells // The Journal of experimental biology. 1997. Vol. 200, iss. 2. P. 343–352. <https://doi.org/10.1242/jeb.200.2.343>
- Holden J.A., Pipe R.K., Quaglia A. & Ciani G. Blood cells of the arcid clam, *Scapharca inaequalis* // Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. 1994. Vol. 74, iss. 2. P. 287–299. <https://doi.org/10.1017/S0025315400039333>
- Jackson P.S., Morrison R., Strange K. The volume-sensitive organic osmolyte-anion channel VSOAC is regulated by nonhydrolytic ATP binding // American Journal of Physiology-Cell Physiology. 1994. Vol. 267, iss. 5. P. C1203–C1209. <https://doi.org/10.1152/ajp-cell.1994.267.5.C1203>
- McFarland K., Donaghy L., Volety A.K. Effect of acute salinity changes on hemolymph osmolality and clearance rate of the non-native mussel, *Perna viridis*, and the native oyster, *Crassostrea virginica*, in Southwest Florida // Aquatic Invasions. 2013. Vol. 8, iss. 3. P. 299–310. <https://doi.org/10.3391/ai.2013.8.3.06>
- Morello E.B., Solustri C., Frogliа C. The alien bivalve *Anadara demiri* (Arcidae): a new invader of the Adriatic Sea, Italy // Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. 2004. Vol. 84, iss. 5. P. 1057–1064. <https://doi.org/10.1017/S0025315404010410h>
- Poutiers J.M. Gastropods // FAO species identification guide for fishery purposes. The living marine resources of the Western Central Pacific. 1998. Vol. 1. P. 363–648.
- Revkov N.K., Abaza V., Dumitrache C., Todorova V., Konsulova T., Mickashavidze E. ... & Kucheruk N.V. The state of zoobenthos // Commission on the Protection of the Black Sea Against Pollution. 2008. P. 243–290.
- Solan M., Whiteley N. Stressors in the marine environment: physiological and ecological responses; societal implications. Oxford University Press, 2016. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198718826.001.0001>
- Soldatov A., Kukhareva T., Morozova V., Richkova V., Andreyeva A., Bashmakova A. Morphometric parameters of erythroid hemocytes of alien mollusc *Anadara kagoshimensis* under normoxia and anoxia // Ruthenica. 2021. Vol. 31, iss. 2. P. 77–86. [https://doi.org/10.35885/ruthenica.2021.31\(2\).3](https://doi.org/10.35885/ruthenica.2021.31(2).3)
- Soldatov A.A., Kukhareva T.A., Andreeva A.Y., Efremova E.S. Erythroid elements of hemolymph in *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) under conditions of the combined action of hypoxia and hydrogen sulfide contamination // Russian Journal of Marine Biology. 2018. Vol. 44, iss. 6. P. 452–457. <https://doi.org/10.1134/S1063074018060111>
- Torre A., Trischitta F., Corsaro C., Mallamace D., Faggio C. Digestive cells from *Mytilus galloprovincialis* show a partial regulatory volume decrease following acute hypotonic stress through mechanisms involving inorganic ions // Cell biochemistry and function. 2013. Vol. 31, iss. 6. P. 489–495 <https://doi.org/10.1002/cbf.2925>
- Zhang M., Li L., Liu Y., Gao X. Effects of a Sudden Drop in Salinity on Immune Response Mechanisms of *Anadara kagoshimensis* // International journal of molecular sciences. 2019. Vol. 20. No. 18. P. 4365.
- Zhivoglyadova L.A., Revkov N.K., Frolenko L.N., Afanasyev D.F. The Expansion of the Bivalve Mollusk *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) in the Sea of Azov // Russian Journal of Biological Invasions. 2021. Vol. 12, iss. 2. P. 192–202. <https://doi.org/10.1134/S207511721020120>

ADAPTATION OF *ANADARA KAGOSHIMENSIS* (TOKUNAGA, 1906) TO HYPO- AND HYPEROSMOTIC ENVIRONMENTAL CONDITIONS: HEMOCYTE RESPONSE

© 2023 Kukhareva T.A.*, Rychkova V.N.**, Soldatov A.A.***, Andreyeva A.Yu.****, Kladchenko E.S.*****

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of the RAS, Sevastopol, 299011, Russia
e-mail: *altali@yandex.ru; **novitsky_valya@mail.ru; ***alekssoldatov@yandex.ru; ****andreevaal@gmail.com; *****kladchenko_ekaterina@bk.ru

Anadara kagoshimensis (Tokunaga, 1906) is an invasive species that has successfully colonized the waters of the Black Sea and the sea of Azov, despite the significantly lower salinity level of these waters in comparison with the native region. The morphological and morphometric characteristics of bivalve mollusk *A. kagoshimensis* erythrocytes were analyzed by light microscopy during adaptation to hypo- and hyperosmotic experimental conditions. The control group of mollusks was kept at 18‰ salinity. Experimental groups were acclimated to 8, 14, 35 and 45 ‰ salinity. A decrease of salinity was achieved by diluting seawater with distilled water at a rate of 1.5 ± 0.5 ‰ per day. Sea salt was added to each aquarium to increase salinity. Salinity was increased at a rate of 2.5 ± 0.5 ‰ per day. Exposure period was 2 days. It has been shown that the salinity range of 14–35 ‰ is natural for ark clam. No significant changes in cell morphology were observed under these conditions. At the same time, environmental salinity levels of 8 and 45‰ caused obvious stress: cellular anomalies appeared, and the linear characteristics of erythrocytes were changed. However, cell lysis did not occur, the values of the specific surface area and nuclear-cytoplasmic ratio did not change. The results of the present work indicate the ability of the ark clam to exist for some time in regions with extremely low and high salinity of the aquatic environment.

Keywords: ark clam, erythrocytes, hypo- and hyperosmotic stress, light optical microscopy, morphometry.